



6)

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 39 573 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

②① Aktenzeichen: 198 39 573.6
②② Anmeldetag: 31. 8. 1998
④③ Offenlegungstag: 9. 3. 2000

⑦① Anmelder:
Rölleke, Sabine, Dr., Wien, AT; Krech, Ralph, Wien,
AT

⑦④ Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑤ Entgegenhaltungen:
DE 43 30 307 A1
DE 39 27 467 A1
EP 07 74 517 A1
Millar M.R. et al., J. Clin. Microbiol. 34 (1996)
2506-2510;
Rölleke S. et al., Appl. Envir. Microbiol. 62
(1996) 2059-2065;
Muyzer G. et al., Appl. Envir. Microbiol. 59
(1993) 695-700;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure-Fragmenten
⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis für
Nukleinsäuren in einer Probe sowie eine Vorrichtung zur
Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

198 39 573 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis für Nukleinsäuren in einer Probe, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

1. Herkömmliche Verfahren

1.1 Klassische Verfahren

Klassische mikrobiologische Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Proben beruhen auf einer Kultivierung der Keime und anschließender Bestimmung auf speziellen Nährmedien, die für bestimmte Mikroorganismen spezifisch sind. Mit diesen Verfahren ist jedoch ein Zeitaufwand von mehreren Tagen verbunden.

1.2 Nukleinsäure-Nachweisverfahren

Eine schnellere Bestimmung kann durch Nukleinsäure-Nachweisverfahren erfolgen.

Bei herkömmlichen DNA-analytischen Nachweisverfahren handelt es sich um PCR-Testsysteme, die gegenüber den oben genannten klassischen Methoden einen schnelleren und sensitiveren Nachweis von Keimen in Proben erlauben. Spezifische PCR-Testsysteme weisen jeweils einen bestimmten Keim oder eine Gruppe von Keimen (ohne weitere Spezifizierungsmöglichkeit) nach (z. B. Salmonellen auf Hühnchen, Borrelien in Blut, eine gentechnisch veränderte Starterkultur in Joghurt, Babesien in Katzenblut). Eine besondere und neuere Form eines PCR-Testsystems ist die sogenannte "Multiplex PCR". Sie basiert auf der Verwendung von mehreren spezifischen Primerpaaren in einem einzigen Reaktionsansatz (z. B. Nachweis von Borrelien, FSME und Rickettsien in einer Reaktion). Gemeinsam ist diesen Nachweisverfahren (auch Multiplex-PCR),

- a) daß sie für jeden nachzuweisenden Keim entwickelt werden müssen. Dies ist zeitaufwendig und teuer; und
- b) es werden nur solche Keime nachgewiesen, nach denen auch gesucht wird. Beispielsweise kann mit einem spezifischen PCR-Test auf Borrelien kein anderer Keim identifiziert werden. Dies hat zur Folge, daß häufig pathogene (Mikro-)Organismen (etwa in Lebensmitteln oder klinischen Proben) nicht gefunden werden.

2. Sequenzspezifische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.1 Gele mit Denaturierungsgradienten

Diese Verfahren beruhen darauf, daß Sequenzvariationen zwischen verschiedenen DNA-Molekülen zu einem veränderten Schmelzverhalten der Doppelstränge führen. Diese unterschiedlich stark aufgeschmolzenen Doppelstränge besitzen trotz gleicher Länge eine unterschiedliche Mobilität in einer Gelmatrix. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich sog. Schmelzdomänen ausbilden, d. h. Abschnitte innerhalb des DNA-Fragments, in denen die DNA denaturiert. Verfahren, die auf diesem Prinzip beruhen, sind die DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese) und TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Temperaturgradienten-Gelelektrophorese), die z. B. bei Millar et al. (J. Clinical Microbiol., 34, 2506-25110 (1996)), Muyzer et al. (Appl. Envir. Micro-

werden die DNA-Fragmente auf Acrylamid-Gelen aufgetrennt, welche eine ansteigende Konzentration an Denaturierungsmitteln aufweisen. Bei einer Konzentration, die für jede Sequenz spezifisch ist, wird die DNA denaturiert, was sich in einer stark verlangsamten Migrationsgeschwindigkeit oder Stillstand der Banden bemerkbar macht.

Zur Optimierung der Auftrennung von DNA-Fragmenten in der DGGE/TGGE wird bisher im allgemeinen eine GC-Klammer (GC-reiche Region, die in der Regel ca. 40 Basen lang ist) über die PCR an die aufzutrennenden Fragmente angehängt. Damit soll verhindert werden, daß sich einzelne Nukleinsäure-Stränge gänzlich voneinandertrennen. In bisherigen manuellen DGGE/TGGE Verfahren konnte mit dieser Klammer eine erheblich bessere Auftrennung der Fragmente erreicht werden, weil die Fragmente fast völlig zum Stillstand kommen, distinkte Banden formen und deshalb manuell aus dem Gel ausgeschnitten werden können. Eine Online-Detektion während der Migration ist mit einer solchen Technologie allerdings nicht möglich.

Bisher mußte immer das gewünschte DNA-Fragment durch Ausschneiden des betreffenden Gelstücks aus dem Gel isoliert werden, was wiederum aufwendige Arbeitsschritte mit sich bringt. Zudem ist eine Elution aus ausgeschnittenen Gelstücken immer mit einem großen Verlust im Nukleinsäurematerial verbunden.

Die Anwendung der DGGE zum Nachweis von Mikroorganismen ist bereits für durch Mikroorganismen geschädigte Wandgemälde (Fresken) beschrieben worden (Rölleke et al., Appl. Environm. Microbiol. 62, 2059-2065 (1996)). Auch in der medizinischen Diagnostik wurde dieses Verfahren zur Untersuchung von Säuglingsfäkalproben bereits verwendet (Millar et al., J. Clin. Microbiol. 34, 2506-2510 (1996)). Allerdings wurde eine automatisierte Detektion bisher noch nicht vorgeschlagen.

2.2 Sequenzspezifische DNA-Liganden

Gleich große, aber in der Sequenz verschiedene DNA-Moleküle können durch DNA-Liganden, die an bestimmte Sequenzabfolgen binden, voneinander getrennt werden. Diese Trennung beruht darauf, daß die spezifischen kurzen Sequenzabfolgen, an die der DNA-Ligand bindet, in DNA-Molekülen mit unterschiedlicher Sequenz in unterschiedlicher Anzahl auftreten, so daß unterschiedliche Anzahlen der DNA-Liganden an ein bestimmtes DNA-Molekül binden. Dies führt dann zu einer Änderung des Gewichtes und der Größe des DNA-Ligand-Komplexes, wodurch dann eine sequenzspezifische Auftrennung ermöglicht wird. Ein Beispiel für einen spezifischen DNA-Liganden ist das Bisbenzimid-PEG-Konjugat, Handelsname: H.A.-Yellow, was unter anderem bei Müller et al. (NAR, 25, 5125-5126 (1997)) beschrieben ist. Die Detektion erfolgte durch Ethidium-Bromid-Färbung der Agarosegele nach der Elektrophorese und anschließendes Photographieren unter UV-Licht. Ein Hinweis auf eine automatisierte Detektion findet sich nicht. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist allerdings, daß es nicht zwischen allen möglichen Sequenzvariationen unterscheidet. Bei H.A. Yellow verursacht z. B. CAC→CGC keine Mobilitätsveränderung.

2.3 rSSCP/DNA-SSCP (RNA/DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)

Einzelsträngige Nukleinsäuren bilden unter nicht-denaturierenden Bedingungen eine Sekundärstruktur aus, d. h. es entstehen doppelsträngige Bereiche. Unterschiedliche Se-

halten für gleich lange Fragmente mit unterschiedlicher Sequenz ergibt. Im Stand der Technik ist rSSCP im Vergleich mit DNA-SSCP beispielsweise durch Sarka et al. (Nar, 20, 871-878 (1992)) beschrieben. Zur Detektion wurden die Nukleinsäuren vor der Auftrennung auf einen Polyacrylamidgel markiert und das Gel und UV-Licht photographiert. Auch hier würde eine automatisierte Detektion eine große Zeitersparnis bedeuten.

3. Gegenstand der Erfindung

An die Analyseverfahren der klinischen Diagnostik, z. B. auf dem Gebiet der Parasitologie, und der Lebensmittelanalytik werden zunehmend höhere Anforderungen gestellt. Hierbei ist vor allen Dingen die Zeit ein wichtiger Faktor. Beispielsweise ist der Nachweis von relevanten Organismen, z. B. Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen und andere Einzeller, aber auch höhere Organismen, wie etwa Parasiten, Würmer oder auch Pflanzen, Säugetiere und Menschen, sehr zeitaufwendig und oftmals sogar unmöglich. Dies beruht auf dem Mangel an automatisierten Nachweisverfahren, welche eine Probenanalyse bei geringem Zeitaufwand und mit geringen Kosten und wenigen Arbeitsschritten ermöglichen.

Wie bereits erwähnt, müssen in bekannten Nukleinsäure-Nachweisverfahren die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend entweder wiederum amplifiziert oder sequenziert werden. Die Sequenzen werden dann mit Sequenzen von bekannten Mikroorganismen verglichen und so bestimmten Mikroorganismen zugeordnet.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis für Nukleinsäuren in einer Probe bereitzustellen, welches für eine schnelle und kostengünstige Analyse von DNA-Proben geeignet ist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Probe, die verschiedene Organismen oder genetisches Material davon enthalten kann,
- (b) organismusübergreifendes Erzeugen von Nukleinsäureabschnitten der Organismen, die eine sequenzspezifische Zuordnung zu den entsprechenden Organismen erlauben,
- (c) sequenzspezifisches Auftrennen der Nukleinsäureabschnitte mittels Migration durch eine Matrix,
- (d) automatisiertes Detektieren der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte während oder/und nach der Migration,
- (e) mindestens teilweises Identifizieren der Nukleinsäureabschnitte aufgrund ihrer Mobilität,
- (f) gegebenenfalls Sammeln der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte.

In diagnostischen und analytischen Nachweisverfahren kann diese Probe beispielsweise Wasser, Abwasser oder eine sonstige Flüssigkeit, z. B. eine Körperflüssigkeit sein, wie etwa Blut, Urin, Speichel, Kot und dergleichen, sowie Gewebe- und Zellproben. In der Lebensmittelanalytik können jedwede Lebensmittelproben, wie etwa Fleisch, Milchprodukte u. ä. untersucht werden. Außerdem können mit dem hier vorgeschlagenen Verfahren auch Werkstoffe, wie etwa Baumaterial, sowie Kunstobjekte oder Antiquitäten untersucht werden.

gespalten oder vervielfältigt, aufgetrennt und detektiert. Bevorzugt werden die Nukleinsäureabschnitte durch eine Vervielfältigung erzeugt. Die Vervielfältigung besteht in einem organismusübergreifenden Amplifizieren von Nukleinsäureabschnitten der zu untersuchenden biologischen Organismen. Bevorzugt wird die organismusübergreifende Amplifikation als PCR durchgeführt. Andere Amplifikationsformate sind jedoch ebenfalls denkbar. Beispiele hierfür sind die im Stand der Technik bekannten und dem Fachmann geläufigen NASBA- oder LCR-Verfahren. Zu amplifizierende Zielsequenzen werden aus innerhalb der definierten Organismengruppe hochkonservierten Sequenzen ausgewählt, wobei die Organismen aus beliebigen Organismen, wie Prokaryonten, Eukaryonten und Archaea, oder auch aus mehrzelligen Organismen, wie Pflanzen, Parasiten, Würmern, Säugern etc. (siehe oben) ausgewählt werden können. Als geeignete Zielsequenz haben sich für ribosomale RNA codierende DNA-Sequenzen, erwiesen z. B. beim Nachweis von Bakterien die für 16S rRNA codierenden DNA-Sequenzen. Derartige Amplifikationsverfahren sind beispielsweise bei Medlin et al., Gene 71, 491-499 (1988), und Muyzer et al. (supra) beschrieben. Bei der (PCR)-Amplifikation ist zu amplifizierende Nukleinsäure bevorzugt DNA oder RNA, und die Nukleinsäureabschnitte (Amplifikationsprodukte) sind bevorzugt DNA.

Es ist jedoch auch denkbar, die zu untersuchenden Nukleinsäureabschnitte auf andere Art und Weise zu erzeugen, beispielsweise durch Klonierung oder andere Arten der Nukleinsäuresynthese. Die zu untersuchenden Nukleinsäuren können auch z. B. chemisch, physikalisch oder enzymatisch in Abschnitte gespalten werden (spezifische Fragmentierung).

Ein geeigneter PCR-Primer für die Detektion von Bakterien ist beispielsweise bei Rölleke et al. (supra) beschrieben, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden muß. Der organismusübergreifend amplifizierten DNA-Fragmente haben vorzugsweise eine Länge zwischen 100 und 2000 bp, können jedoch auch erheblich größer oder kleiner sein. Bevorzugt ist eine Länge um 200 bp, wie bei Rölleke et al. beschrieben. Derzeit bevorzugt handelt es sich für Bakterien um 16S rDNA amplifizierende Primer, wobei das Verfahren selbstverständlich auch für die Untersuchung von Abschnitten aus anderen Genen anwendbar ist. Das erfindungsgemäße Verfahren kann nicht nur spezies- oder organismusspezifische Amplifikationsprodukte nachweisen, sondern es ermöglicht auch überraschenderweise bei Auswahl von geeigneten Primern den Nachweis von genetisch (gentechnologisch) veränderten Organismen. Dieser Aspekt ist insbesondere in der Lebensmittelanalytik von Bedeutung, da Nahrungsmittel in zunehmendem Maße gentechnisch veränderte Pflanzenbestandteile oder andere Organismen (beispielsweise Joghurtkulturen) enthalten. Die zu untersuchenden Nukleinsäurefragmente können während oder nach der Amplifizierung gegebenenfalls auch markiert werden, beispielsweise durch den Einbau von radioaktiven Nukleotiden.

Vorzugsweise sind die markierenden Gruppen jedoch nicht radioaktiv, sondern basieren beispielsweise auf fluoreszierenden Molekülen.

Organismenübergreifend bedeutet bei einem Erzeugen von Nukleinsäureabschnitten durch Amplifikation, daß beispielsweise Nukleinsäuren einer definierten Gruppe selektiv amplifiziert werden können. Da für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt Nukleinsäureabschnitte mit gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz verglichen werden, bedeutet organismusübergreifend zum einen, daß die Nukle-

erzeugt werden (z. B. aus demselben Gen). Damit ist z. B. ein genus-, gattungs-, oder auch speziesübergreifender Nachweis möglich. Andererseits können aber auch individuellen-spezifische Nukleinsäuren unterschieden werden. Dies ist besonders bei der Erstellung und Untersuchung von genetischen Fingerabdrücken von Bedeutung. Es können aber auch Polymorphismen nachgewiesen werden, indem Nukleinsäureabschnitte aus polymorphen Regionen des Genoms verwendet werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden die für "herkömmliche" Nukleinsäure-Nachweisverfahren vorhandenen Einschränkungen überwunden. So erlaubt die Verwendung der organismusübergreifenden Primer, die an zwischen einzelnen Mitgliedern der Gruppe hochkonservierte Bereiche binden, den Nachweis aller Gruppenmitglieder, ohne sie vorher zu erkennen oder nach ihnen spezifisch zu suchen. Durch entsprechende Primerwahl können beispielsweise (Mikro-)Organismen einer bestimmten definierten Gruppe, z. B. alle Bakterien oder alle Pilze oder alle Eukaryonten oder alle gram-positiven Bakterien, alle Spezies des Genus Salmonella etc. nachgewiesen werden.

Ein besonderer Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, daß bei Verwendung von Referenzen als Standard – wie weiter unten ausführlich erläutert – auf beliebig viele Organismen gleichzeitig getestet werden kann. Weiterhin können auch Organismen aufgefunden werden, die nicht im Standard enthalten sind, beispielsweise weil sie vorher gar nicht oder noch nie in einem bestimmten Probenmaterial detektiert wurden. Dieses Auffinden neuer Organismen kann durch Sequenzieren von nicht den Referenzen entsprechenden Banden erfolgen. Dieser Vorteil ist besonders deshalb wichtig, weil nach herkömmlichen Methoden nur diejenigen Sequenzen gefunden werden können, nach denen gezielt gesucht wird.

Darüber hinaus erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren in vielen Fällen auch die Detektion genetisch veränderter Organismen.

Zum sequenzspezifischen Auftrennen werden die in Schritt (b) erhaltenen Nukleinsäureabschnitte in eine Matrix eingebracht. Die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Matrix erlaubt das sequenzspezifische Auftrennen von Nukleinsäureabschnitten in räumlich voneinander getrennte Banden. Bevorzugt ist diese Matrix eine Gelmatrix, wie etwa ein Agarose- oder Polyacrylamidgel, und die Migration durch die Matrix erfolgt bevorzugt durch Elektrophorese. Erfindungsgemäß ist es auch denkbar, als Matrix eine Flüssigkeit oder einen festen Stoff zu verwenden, beispielsweise für eine Auftrennung über Zentrifugation oder Chromatographie/Massenspektroskopie.

Die zu untersuchenden Nukleinsäureproben werden vor dem Einbringen in die Matrix bevorzugt in einer bestimmten Menge Wasser oder Puffer gelöst. Der Trennmatrix kann bevorzugt eine Sammelmatrix, z. B. ein Sammelgel, vorgeschaltet sein. Durch die Sammelmatrix wird eine verbesserte Detektion auch geringer Unterschiede ermöglicht, da die Nukleinsäurefragmente während ihrer Wanderung durch die Sammelmatrix auf einen sehr begrenzten Bereich komprimiert werden, so daß am Beginn der Trennmatrix ein einheitlicher Migrationsanfangspunkt vorliegt. Als Sammelmatrix wird z. B. ein nichtdenaturierendes Gel mit geringerer Konzentration als das Trenngel verwendet.

In Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein sequenzspezifisches Auftrennen der Nukleinsäureabschnitte oder Amplifikationsprodukte in Fraktionen mit unterschiedlicher Mobilität durchgeführt. Diese Auftrennung kann nach einem der bereits genannten Verfahren DGGE, TGGE,

findungsgemäß verwendbaren Verfahren umfassen natürlich auch Abwandlungen der oben genannten Auftrennungsverfahren, wie sie z. B. durch Veränderung einzelner Parameter, wie etwa der Puffer- oder Denaturierungsmittelkonzentration, entwickelt werden können.

Bei der Migration durch eine Matrix wandern manche Nukleinsäuremoleküle schneller als andere, was dann eine Auftrennung von Fraktionen, die gleichartige Nukleinsäurefragmente enthalten, in sogenannte Banden zur Folge hat. Im Stand der Technik wurden diese Banden immer manuell und stehend detektiert, z. B. als Fotografie unter UV-Licht oder als Autoradiographie.

Wie oben bereits erwähnt, werden bei im Stand der Technik bekannten TGGE- oder DGGE-Auftrennungsverfahren üblicherweise GC-Klammern eingesetzt mit dem ebenfalls bereits erläuterten Nachteil, daß es dadurch zu einem Stillstand der Banden auf der Matrix kommt und eine Online-Detektion nicht möglich ist. Gleichzeitig würde aber das Weglassen einer solchen Klammer unter Beibehalten der bisherigen Auftrennungsmethode dazu führen, daß die Banden nicht mehr distinkt voneinander getrennt werden könnten, sondern sich Einzelstränge abtrennen würden, die nicht mehr detektiert werden könnten. Deshalb umfaßt die vorliegende Erfindung auch eine völlige technische Veränderung der bislang bekannten Gradiententechnologie. Dies kann wie folgt geschehen:

a) Modifizierung des Gradienten

Die vorliegende Erfindung verwendet bevorzugt einen chemischen Stoff (beispielsweise Harnstoffe oder dergleichen zur Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen-Komplementären. Die Konzentration dieses Stoffes in der Matrix variiert in definierter Weise bis zu einem Punkt, in dem die Nukleinsäure-Sequenzen zwar je nach ihrer Zusammensetzung früher oder später voneinander aufgetrennt werden (Schmelzpunkt), jedoch durch die Spaltung der Wasserstoffbrücken nicht gänzlich zum stehen kommen, sondern weiter durch die Matrix mitgieren. Das gleiche Ergebnis kann auch durch eine definierte Abfolge von Temperaturveränderungen erfolgen oder durch Verwendung eines sonstigen chemischen oder physikalischen Vorgangs, mit dessen Hilfe Wasserstoffbrücken zwischen den Basen-Komplementären kontrolliert gespalten oder eine solche Spaltung gestoppt werden können. Dieses System kann erfindungsgemäß jedoch auch gekoppelt werden mit einem Anhängen einer in ihrer Anzahl und Zusammensetzung so gewählten GC Komponente, daß sich die Nukleinsäure-Stränge nicht gänzlich voneinander trennen.

b) Modifizierung der Elektrophoresbedingungen

Eine Detektion während der Migration ist auch möglich, indem eine Abfolge definierter Stromspannungsveränderungen während der Migrationsphase erfolgt. Dabei wird bevorzugt zum Ende der Migrationsphase die Stromspannung erheblich erhöht werden, um zu gewährleisten, daß auch solche Fragmente, deren Wasserstoffbrücken fast vollständig aufgetrennt wurden, nicht gänzlich zum Stillstand kommen.

Gleichfalls ist das Stehenbleiben der zu detektierenden Banden auch durch eine Abfolge definierter Veränderungen der Orientierung des Stromspannungsfeldes möglich.

Die vorliegende Erfindung demonstriert, daß überraschenderweise auch für die oben genannten Auftrennungsverfahren eine automatisierte Detektion, d. h. eine Detektion

Online-Detektion, bei der der Detektor mit einer Steuereinheit verbunden ist, welche die Identifizierung der Banden erlaubt. Dabei werden die Banden vorzugsweise durch einen nahe dem Ende der Matrix platzierten und im allgemeinen stationären Detektor erfaßt. Da dies zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab dem Zeitpunkt des Beginns der Migration geschieht, können den einzelnen Banden jeweils unterschiedliche Werte für die Mobilität zugeordnet werden. Diese ergibt sich aus dem in einer bestimmten Zeit und unter bestimmten Bedingungen (wie etwa Pufferkonzentration, Gelkonzentration, Temperatur, Spannung und dergleichen) zurückgelegten Weg ab dem Punkt des Migrationsbeginns bis zum Detektor. Besonders bevorzugt erfolgt die Detektion während der Wanderung der Banden durch die Matrix, sie kann aber auch anschließend erfolgen.

Alternativ können jedoch auch andere automatisierte Detektionsmöglichkeiten verwendet werden. So können nach sequenzspezifischer Auftrennung, bei der die Fragmente innerhalb der Matrix zum Stehen kommen, wie üblicherweise bei bekannten DGGE- und TGGE-Verfahren, ein digitales Bild des Bandenmusters erstellt werden, indem ein mobiler Detektor verwendet wird, der z. B. nach der Auftrennung an der Auftrennmatrix entlangfährt und gegebenenfalls die gewünschten Banden automatisch aus dem Gel abgesogen werden. Dies könnte durch Kombination der Auftrennmatrix mit einem Vakuumbloßsystem erfolgen, welches in der Lage ist, ein punktgenaues Vakuum an der Matrix anzulegen, wodurch spezifische Fragmente selektiv abgesogen und in einem Behälter aufgefangen werden können.

Da die Mobilität für Nukleinsäurefragmente gleicher Länge sequenzspezifisch ist, können die Nukleinsäureabschnitte oder Amplifikationsprodukte aufgrund ihrer Mobilität identifiziert werden. Die Identifizierung kann auf zwei Arten erfolgen. In einer ersten Ausführungsform migrieren gleichzeitig mit der Probe bekannte Standards durch die Matrix mit. Diese Standards enthalten Nukleinsäureabschnitte, z. B. Amplifikationsprodukte von Nukleinsäuren bekannter Organismen, die wie auch die Probe auf der Matrix aufgetrennt werden. Durch den Vergleich der Mobilitäten der Nukleinsäureabschnitte aus der Probe mit den Nukleinsäureabschnitten aus dem Standard wird eine Identifizierung ermöglicht. Es ist jedoch auch möglich und bevorzugt, daß der Detektor an eine Steuereinheit angeschlossen ist, welche unter anderem eine Datenbank mit gespeicherten Informationen zu Mobilitäten bekannter Sequenzen enthält. Diese wurden durch Migration durch eine erfindungsgemäße Matrix oder denselben Bedingungen ermittelt, wie diejenigen, unter denen die zu untersuchenden Proben durch die Matrix migrieren. Auf diese Weise können die vom Detektor ermittelten Mobilitätswerte mit gespeicherten Daten verglichen werden und die Identifizierung auf diese Weise erfolgen.

Die Standards umfassen z. B. ein Standardset A und ein Standardset B, welche jeweils Nukleinsäureabschnitte von Nukleinsäuren aus bekannten pathogenen und nichtpathogenen Organismen enthalten. Da das erfindungsgemäße Verfahren für im lebensmittelanalytische und klinisch diagnostische Verfahren geeignet ist, werden bevorzugt Organismen, wie etwa Einzeller, z. B. Parasiten, Bakterien, Pilze und Hefen nachgewiesen. Bekannte pathogene Organismen, deren Nukleinsäurefragmente in Standard A enthalten sind, umfassen z. B. Salmonellen, Listerien, pathogene E.coli etc. Standardset B umfaßt beispielsweise in lebenden Joghurtkulturen anzutreffende Bakterien wie etwa Lactobacillus thermophilus. Es können auch Nukleinsäuren als Standards verwendet werden, die aus Organismen mit gentechnolo-

Weiterhin können die Standards auch Nukleinsäureabschnitte von Parasiten, z. B. Einzellern oder Würmern oder dergleichen enthalten. Prinzipiell sind Nukleinsäureabschnitte von allen obengenannten Organismen geeignet. Ebenso können auch Standards mit menschlichen Nukleinsäureabschnitten erstellt werden, z. B. zur Verwendung in der forensischen Medizin oder Kriminalistik.

Da bei einem solchen Verfahren und insbesondere unter Verwendung von bestimmten Standardsets nicht immer alle Banden identifiziert werden können, besteht zusätzlich die Möglichkeit, einzelne Banden mit aufgetrennten Nukleinsäureabschnitten zu sammeln. Dies ist möglich, da alle Banden beliebig lange durch die Matrix migrieren können und somit auch an einem bestimmten Zeitpunkt das Ende der Matrix erreichen. Sobald sie aus der Matrix austreten, können sie mit Hilfe von Kollektorbehältern aufgefangen werden. Im Gegensatz zu früheren Verfahren, wo immer bestimmte Banden aus dem Gel ausgeschnitten werden mußten und durch aufwendige Verfahren extrahiert werden mußten, können hier die Banden direkt aufgefangen werden, was zeit- und kostengünstiger ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren verschiedener Organismen in einer Probe für lebensmittelanalytische oder parasitologische Zwecke umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Probe, die verschiedene Organismen oder genetisches Material davon enthalten kann,
- (b) organismusübergreifendes Erzeugen von Nukleinsäureabschnitten der Organismen, die eine sequenzspezifische Zuordnung zu den entsprechenden Organismen erlauben,
- (c) sequenzspezifisches Auftrennen der Nukleinsäureabschnitte mittels Migration durch eine Matrix,
- (d) Detektieren der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte,
- (e) mindestens teilweises Identifizieren der Nukleinsäureabschnitte aufgrund ihrer Mobilität,
- (f) gegebenenfalls Sammeln der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können zusätzlich auch genetisch veränderte Organismen detektiert werden. Wie bereits erwähnt, ist dies von großer Bedeutung in der Lebensmittelanalytik, wenn z. B. genetisch veränderte Organismen, wie Pflanzen oder Tiere, identifiziert werden sollen, sofern noch genetisches Material in Nahrungsmitteln vorhanden ist. Die Identifizierung kann positiv erfolgen, indem bekannt genetisch veränderte Sequenzen bereits als Standard gespeichert sind oder als Kontrolle mitlaufen, oder negativ, wobei dann ein Sequenzierungsschritt erfolgen kann. Insbesondere sind hier das DGGE- oder TGGE-Verfahren vorteilhaft eingesetzt, da dadurch eine besonders spezifische Auftrennung von Nukleinsäureabschnitten mit gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz erfolgen kann.

Außerdem betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens. Diese Vorrichtung umfaßt

- (a) eine Matrix mit gegebenenfalls vorgeschalteter Sammelmatrix zum sequenzspezifischen Auftrennen in räumlich voneinander getrennte Banden von Nukleinsäureabschnitten mit annähernd gleicher Länge, wobei das Auftrennen mittels Migration der Nukleinsäuren vorzugsweise vollständig durch die Matrix hindurch

aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte während oder/ und nach der Migration durch die Matrix,
(c) gegebenenfalls einen Kollektor zum Sammeln der Fraktionen von Nukleinsäureabschnitten.

Wie bereits oben erwähnt, ist die Matrix bevorzugt ein Gel. Dieses Gel kann in verschiedenen Formen vorliegen, beispielsweise als Platte, Säule, Spiralsäule oder Spule, wodurch besonders lange Migrationswege erzielt werden. Da die Migration bevorzugt durch Elektrophorese durchgeführt wird, ist das Gel bevorzugt von einem Puffer umgeben, welcher bei Anlegen einer Spannung die Migration von Proben durch die Matrix erlaubt. Der Detektor zum Erfassen der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte mit bevorzugt gleicher Länge kann ein stationärer oder mobiler Detektor sein, z. B. ein optischer Detektor wie etwa ein UV-, VIS- oder Infrarot-Detektor. Geeignet sind jedoch im wesentlichen alle Detektorsysteme, die beispielsweise im Rahmen automatischer Sequenzierung verwendet werden.

Eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Ausführungsform der Vorrichtung ist in den Fig. 1 und 2 dargestellt. Dabei befindet sich ein Gel als Matrix (4) in einem Pufferbehälter (1), der mit Puffer (9) gefüllt ist. Der Gelmatrix (4) kann eine Sammelmatrix (2) vorgeschaltet sein, die Schlitze oder Taschen (3) für Proben aufweist. In dem Pufferbehälter (1) kann eine Spannung angelegt werden (5), wobei die Proben von dem Ende der Matrix, das die Taschen enthält, zum anderen Ende migrieren. Nahe dem Ende der Matrix befindet sich ein (IR)-Detektor (6), der mit einer Steuereinheit verbunden sein kann. Am Ende der Matrix befindet sich ein Kollektor (8), der ebenfalls mit der Steuereinheit (7) verbunden ist. In Fig. 3 ist eine ähnliche Anordnung zu sehen, wobei die Matrix hier aus einer Spule besteht.

Der Detektor ist bevorzugt an eine Steuereinheit angeschlossen, umfassend (a) eine Datenbank zum Speichern von Werten für die Mobilität von detektierten Nukleinsäureabschnitten, (b) eine Vergleichs- und Zuordnungseinheit zum Vergleich der Mobilität von Nukleinsäureabschnitten aus einer Probe mit in der Datenbank gespeicherten Standards und zur entsprechenden Zuordnung bei Übereinstimmung, sowie (c) eine Anzeigeeinheit zum Anzeigen von zugeordneten Banden oder nichtzugeordneten Banden. Bevorzugt übermittelt der Detektor ein Signal an die angeschlossene Steuereinheit, beispielsweise einen Computer, mit dessen Hilfe ein digitalisierter Barcode der aufgetrennten Banden aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität erstellt wird (wie beispielsweise das LI-COR-System beim automatischen Sequenzierer). Dabei ist bevorzugt der Detektor so ausgestaltet, daß parallele Bahnen von Banden gleichzeitig detektiert werden können. Dies erlaubt eine automatisierte Detektion von Banden aus Proben mit Banden von Standards bzw. Standardsets. Es müssen jedoch keine Standards gleichzeitig durch die Matrix migrieren, sondern es können Informationen zur Mobilität bereits in einer Datenbank gespeichert sein, wobei dann die vom Detektor ermittelten Daten mit denjenigen aus der Datenbank verglichen werden und somit eine Zuordnung der detektierten Banden zu bestimmten Mikroorganismen oder anderen Organismen erfolgen kann. Die erfindungsgemäße Anzeigeeinheit kann so eingestellt werden, daß sie je nach verwendeten Standardsets alle detektierten Banden, oder beispielsweise nur die pathogenen Organismen zugeordneten Banden anzeigt. Es kann auch ein Kollektor an das System angeschlossen sein, welcher sich zum Sammeln der Fraktionen von Nukleinsäureabschnitten eignet. Hierzu migrieren die Banden bis zum

aus einer Reihe von Gefäßen bestehen, welche beweglich am Ende der Matrix angebracht ist, so daß, wenn eine aus der Matrix ausgetretene Bande in einem Gefäß aufgefangen worden ist, ein leeres Gefäß an diese Stelle rücken kann.

Zusätzlich kann der Kollektor so mit der Steuereinheit verbunden sein, daß nach erfolgtem Detektieren und Vergleich der Probenbanden nur bei bestimmten identifizierten Banden ein Signal an den Kollektor zum Sammeln der in der Bande enthaltenen Nukleinsäureabschnitte weitergeleitet wird. Der Kollektor kann auch aus einer Absaugvorrichtung bestehen.

Bevorzugt ist der Kollektor kompatibel mit automatischen PCR- und Sequenzierautomaten. Es kann sich bei den Kollektorgefäßen beispielsweise um eine Mikrotiterplatte oder um herkömmliche Reaktionsgefäße handeln.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung sind für viele Arten der Analytik und Diagnostik geeignet. Insbesondere ist hier die Lebensmittel- und Abwasseranalytik (z. B. die Reinigung von Biomatten in Klärwerken) zu nennen, sowie die klinische Diagnostik, kriminalistische Analytik, Parasitologie oder der Nachweis von (Mikro-)Organismen auf Kunstobjekten und in Werkstoffen. Außerdem zu nennen ist der Anwendungsbereich der Untersuchung von gentechnologisch veränderten Organismen, insbesondere solchen, die zu Lebensmitteln verarbeitet werden.

Figurenbeschreibung

Fig. 1 zeigt eine Draufsicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung (schematisch) umfassend ein mit Elektrolyse-puffer bedecktes Gel sowie einen Infrarot-Detektor und mehrere Kollektorbehälter, welche mit einer Steuereinheit verbunden sind.

Fig. 2 zeigt eine Seitenansicht der Vorrichtung aus Fig. 1.

Fig. 3 zeigt eine ähnliche Vorrichtung wie in Fig. 1 und 2, außer daß die Matrix in Form einer Spule vorliegt.

Beispiele

Beispiel 1

Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln

In diesem Beispiel wurden 16S rDNA spezifische, bakterielle Primer verwendet, mit denen die 16S rDNA Fragmente aller auf der Hühnerhaut vorhandenen Bakterien amplifiziert wurden. Die Amplifikate wurden dann in einer DGGE-Analyse voneinander getrennt. Als Standard wurde die entsprechende für Salmonella spezifische Bande verwendet. Die Ergebnisse zeigen eindeutig das Vorhandensein der Salmonella-spezifischen Bande in der zu untersuchenden Probe, die damit eindeutig als Salmonella-positiv identifiziert werden konnte.

Durch Verwendung von Standards konnten Salmonella-positiv Proben identifiziert werden.

Beispiel 2

Nachweis unterschiedlicher pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln

In diesem Beispiel wurden dieselben Primer wie in Beispiel 1 verwendet und das Verfahren auf prinzipiell dieselbe Art und Weise durchgeführt. Bei Untersuchungen von Lebensmitteln mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und un-

Mikroorganismen enthält (Salmonellen, Listerien, Toxin produzierende E.colis), konnten kontaminierte und potentiell gesundheitsgefährdende Lebensmittel identifiziert werden.

Beispiel 3

Nachweis von Lebensmittelverfälschungen

Untersucht wurde die Authentizität von Lebensmitteln, d. h. ob Billigmaterial zu hochwertigen Lebensmitteln beigemischt wurde. Durch Untersuchung von Rindfleischproben konnten unter Verwendung von Standards mit Sequenzen von verschiedenen für die Fleischproduktion verwendeten Tierarten (Rind, Schwein, Schaf, Pute, Huhn) verfälschte Lebensmittelproben identifiziert wurden, die nicht nur ein Signal für Rindfleisch, sondern auch für andere Fleischsorten, z. B. Putenfleisch, enthielten.

Geeignet waren solche Primer, die spezifisch sind für phylogenetische Markergene (z. B. ribosomale Gene, Cytochrom b, und andere).

Beispiel 4

Nachweis von Parasiten

Säugetiere können durch eine Reihe von mehr oder weniger gesundheitsgefährdenden Parasiten befallen sein. Beispielsweise führt die Besiedelung der roten Blutkörperchen durch Protozoen häufig zu schweren Krankheiten und Todesfällen bei Mensch und Tier.

Durch eine Untersuchung solcher Blutproben mit organismenübergreifenden Primern können auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen (z. B. alle Protozoen oder alle Piroplasmidien) alle potentiellen Krankheitserreger (wie z. B. Babesien) einer Organismengruppe in einem einzigen Nachweis identifiziert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe, umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Probe, die verschiedene Organismen oder genetisches Material davon enthalten kann,

(b) organismenübergreifendes Erzeugen von Nukleinsäureabschnitten der Organismen, die eine sequenzspezifische Zuordnung zu den entsprechenden Organismen erlauben,

(c) sequenzspezifisches Auftrennen der Nukleinsäureabschnitte mittels Migration durch eine Matrix,

(d) automatisiertes Detektieren der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte während oder/und nach der Migration, (e) mindestens teilweises Identifizieren der Nukleinsäureabschnitte aufgrund ihrer Mobilität,

(f) gegebenenfalls Sammeln der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (d) eine Online-Detektion während der Migration umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein stationärer Detektor verwendet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (d) eine Detektion nach der Migration

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Identifizieren in Schritt (e) durch Vergleich der Mobilität der Nukleinsäureabschnitte mit der Mobilität mindestens eines Standards erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (c) zusätzlich mindestens ein Standard durch die Matrix migriert und in Schritt (d) detektiert wird und das Identifizieren in Schritt (e) durch Vergleich der Mobilitäten der Nukleinsäureabschnitte und des oder der Standards auf derselben Matrix durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Identifizieren in Schritt (e) durch Vergleich der Mobilitäten der Nukleinsäureabschnitte mit in einer Datenbank gespeicherten Werten für die Mobilität des oder der Standards durchgeführt wird, wobei die Werte für die Mobilität des oder der Standards mittels Migration durch eine Matrix unter denselben Bedingungen wie in den Schritten (c) und (d) ermittelt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Identifizieren in Schritt (e) durch eine Steuervorrichtung erfolgt, umfassend eine Datenbank, eine Vergleichs- und Zuordnungseinheit und eine Anzeigeeinheit, wobei die Mobilität der Nukleinsäureabschnitte mit in der Datenbank gespeicherten Werten für die Mobilität des oder der Standards verglichen werden, bei Übereinstimmung eine Zuordnung der Nukleinsäureabschnitte zu bekannten Organismen erfolgt und die zugeordneten Organismen angezeigt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß pathogene Organismen angezeigt werden.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Standardset A, das Nukleinsäureabschnitte bekannter pathogener oder/und genetisch veränderter Organismen enthält, oder/und ein Standardset B, das Nukleinsäureabschnitte von Nukleinsäuren aus nichtpathogenen Organismen enthält, oder ein Gemisch der Standardsets A und B verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (c) eine Migration durch eine Sammelmatrix vorgeschaltet ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gel als Matrix verwendet wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung mittels Elektrophorese erfolgt.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung mit Hilfe einer der folgenden Methoden durchgeführt wird: DGGE (Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese), TGGE (Temperaturgradienten-Gelelektrophorese), sequenzspezifische Bindung an DNA-Liganden, rSSCP (RNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismus), DNA-SSCP (DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismus).

15. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe für lebensmittelanalytische oder parasitologische Zwecke umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Probe, die verschiedene Organismen oder genetisches Material davon enthalten kann,

(b) organismenübergreifendes Erzeugen von Nukleinsäureabschnitten der Organismen, die eine

- (c) sequenzspezifisches Auftrennen der Nukleinsäureabschnitte mittels Migration durch eine Matrix,
 - (d) Detektieren der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte,
 - (e) mindestens teilweises Identifizieren der Nukleinsäureabschnitte aufgrund ihrer Mobilität,
 - (f) gegebenenfalls Sammeln der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Sammeln von Nukleinsäureabschnitten durchgeführt wird, indem die Migration durch die Matrix solange durchgeführt wird, bis die aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte aus der Matrix austreten und mittels eines Kollektors aufgefangen werden.
17. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 16, umfassend:
- (a) eine Matrix mit gegebenenfalls vorgeschalteter Sammelmatrix zum sequenzspezifischen Auftrennen in räumlich voneinander getrennte Bänder von Nukleinsäureabschnitten mit annähernd gleicher Länge, wobei das Auftrennen mittels Migration der Nukleinsäureabschnitte vorzugsweise vollständig durch die Matrix hindurch geschieht,
 - (b) einen Detektor zum Erfassen der aufgetrennten Nukleinsäureabschnitte während oder/und nach der Migration durch die Matrix,
 - (c) gegebenenfalls einen Kollektor zum Sammeln der Fraktionen von Nukleinsäureabschnitten.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor ein stationärer Online-Detektor ist.
19. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor ein mobiler Detektor ist.
20. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Kollektor einen oder mehrere beweglich angeordnete Auffangbehälter umfaßt, die das Auffangen von einzelnen Bändern während oder/und nach der Migration ermöglichen.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich eine Steuereinheit, umfassend eine Datenbank zum Speichern von Werten für die Mobilität von detektierten Nukleinsäureabschnitten, eine Vergleichs- und Zuordnungseinheit zum Vergleich der Mobilität von Nukleinsäureabschnitten aus einer Probe mit in der Datenbank gespeicherten Standards und zur entsprechenden Zuordnung bei Übereinstimmung, sowie eine Anzeigeeinheit zum Anzeigen von zugeordneten Organismen umfaßt.
22. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis von Mikroorganismen in der Lebensmittel- und Abwasseranalytik.
23. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis von Mikroorganismen in der klinischen Diagnostik.
24. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis von Mikroorganismen in der kriminalistischen Analytik.
25. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis von Mikroorganismen in Kunstgegenständen und Werkstoffen.
26. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis von Parasiten, z. B. Würmern oder Einzellern.
27. Anwendung des Verfahrens nach einem der An-

- 28. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 15 bis 17 zum Nachweis der Authentizität von Lebensmitteln.
- 29. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 15 bis 17 zum Nachweis von Parasiten in biologischen Proben.
- 30. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 15 bis 16 zum Nachweis von gentechnologisch veränderten Organismen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

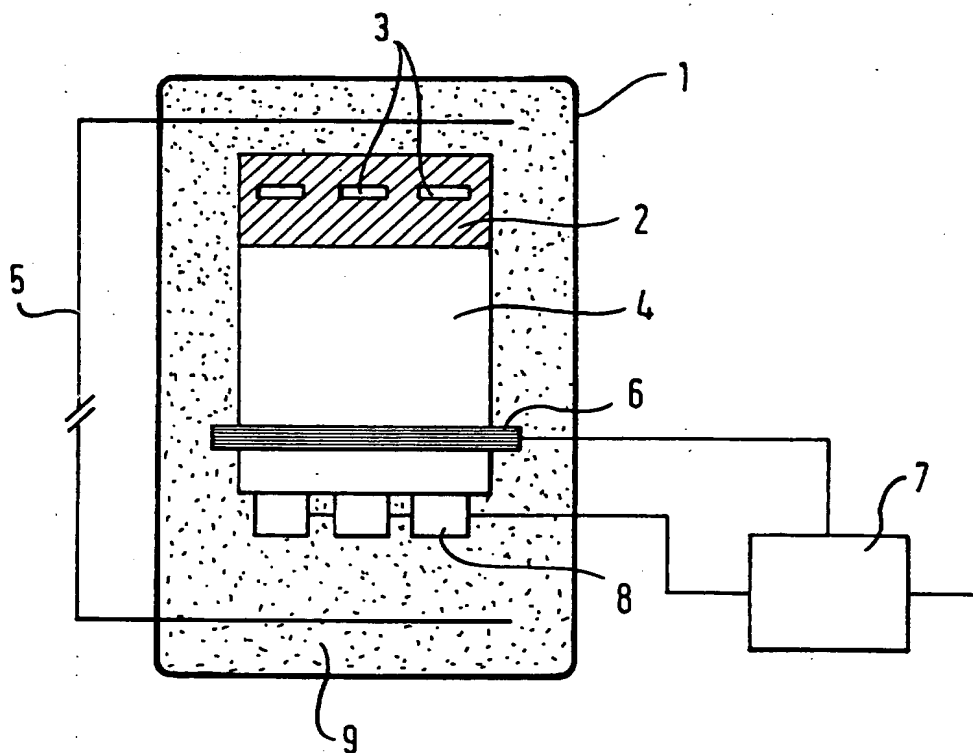


Fig. 2

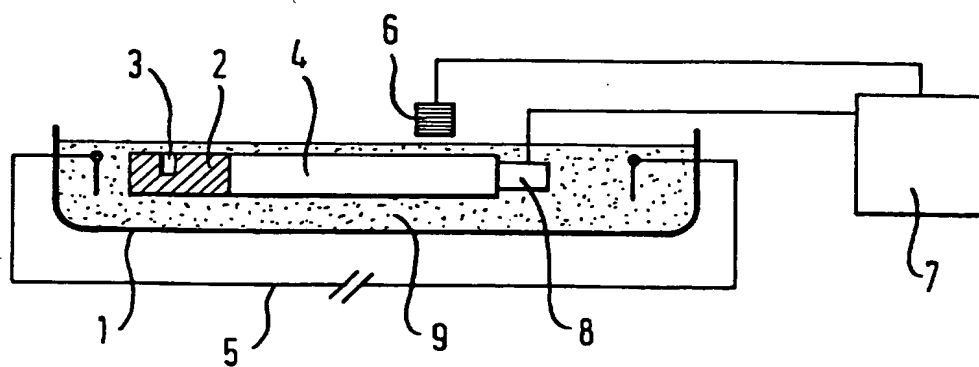
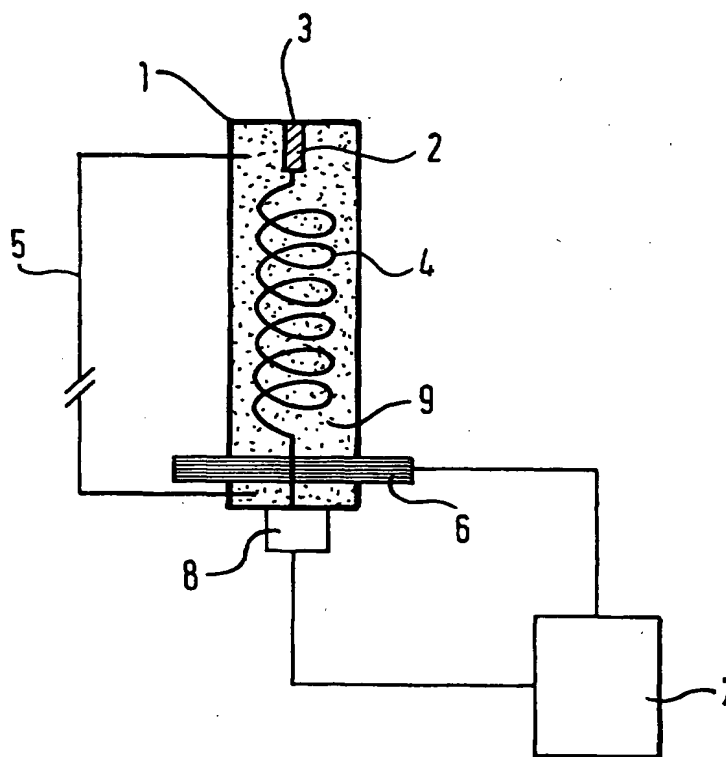


Fig. 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.